

Requested Patent: JP6294771A
Title: ELECTROPHORETIC MEDIUM AND ANALYZING DEVICE USING THE SAME ;
Abstracted Patent: JP6294771 ;
Publication Date: 1994-10-21 ;
Inventor(s): KANBARA HIDEKI; others: 04 ;
Applicant(s): HITACHI LTD ;
Application Number: JP19930080926 19930407 ;
Priority Number(s): ;
IPC Classification: G01N27/447 ;
Equivalents: JP2974537B2 ;

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain an electrophoretic device having a capillary array which holds the features of a capillary system and is easy to handle and inexpensive.

CONSTITUTION: This device has a structure wherein a spacer sheet 3 having a number of grooves is held between two macromolecular sheets 1 and 2. Gel is filled up in the grooves of the spacer sheet 3 and thereby gel capillaries 6 are constructed. The density of the gel capillaries 6 is large on the detecting part side 8 and small on the sample injection part side 7. On the sample injection part side 7, each capillary 5 is separated from others by cutting in order to the device easy to handle.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-294771

(43) 公開日 平成6年(1994)10月21日

(51) IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447				
// C 1 2 M 1/00	Z	7363-2 J	G 0 1 N 27/ 26	3 1 5 A

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-80926

(22) 出願日 平成5年(1993)4月7日

(71) 出願人 000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(72) 発明者 神原 秀記
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72) 発明者 村上 勝彦
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72) 発明者 高橋 智
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

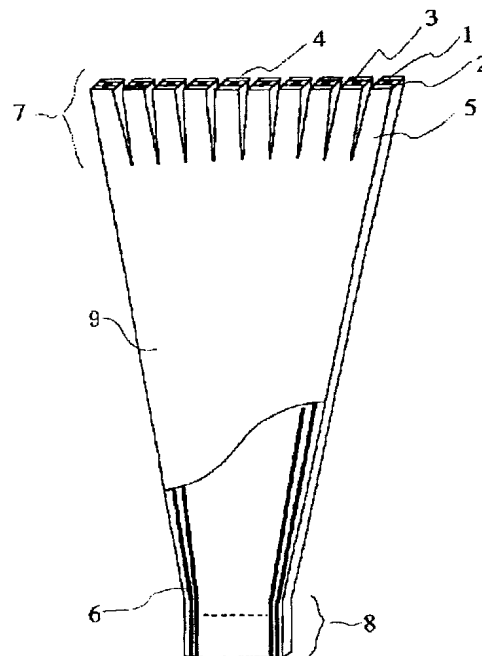
(54) 【発明の名称】 電気泳動媒体及びそれを用いる分析装置

(57) 【要約】

【目的】 キャピラリー方式の特長を保持し、取扱いが容易で廉価なキャピラリーアレー電気泳動装置を提供する。

【構成】 2枚の高分子シート1、2間に多数の溝を有するスペーサシート3を挟んだ構造を有する。スペーサシート3の溝にはゲルを充填してゲルキャピラリー6を構成する。ゲルキャピラリー6の密度は検出部側8で大きく、試料注入部側7で粗である。試料注入部側7は、取扱いを容易にするため、切れ込みを入れて各キャピラリー5を分離している。

【効果】 高分子シートを用いることにより数多くのキャピラリーを1枚のシート中に設けることができ、廉価なゲルキャピラリーアレー板を供給できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 高分子物質によって作製され内部に複数のキャピラリー泳動路を有することを特徴とする電気泳動媒体。

【請求項2】 前記キャピラリー泳動路が少なくとも2枚のシート状高分子フィルムの間に設けられた溝で構成されていることを特徴とする請求項1記載の電気泳動媒体。

【請求項3】 前記キャピラリー泳動路が2枚のシート状高分子フィルムの間に挟まれたスペーサシートによって形成されていることを特徴とする請求項2記載の電気泳動媒体。

【請求項4】 一端部におけるキャピラリー泳動路の配置密度が他端部におけるキャピラリー泳動路の配置密度と異なっていることを特徴とする請求項2又は3記載の電気泳動媒体。

【請求項5】 一端部においてシート状高分子フィルムに切れ目を入れることによって各キャピラリーが先端から所定長さだけ相互に分離されていることを特徴とする請求項2、3又は4記載の電気泳動媒体。

【請求項6】 配置密度が粗である方の端部においてシート状高分子フィルムに切れ目を入れることによって各キャピラリーが先端から所定長さだけ相互に分離されていることを特徴とする請求項4記載の電気泳動媒体。

【請求項7】 前記キャピラリー泳動路の配置密度が粗である側の端部が試料注入側であることを特徴とする請求項4又は6記載の電気泳動媒体。

【請求項8】 前記分離された側のキャピラリー泳動路端部に試料注入部を有することを特徴とする請求項5記載の電気泳動媒体。

【請求項9】 泳動路が複数本の高分子細管からなり、該複数の高分子細管の少なくとも片方の末端が直線状に束ねられていることを特徴とする電気泳動媒体。

【請求項10】 前記泳動路にゲルが充填されていることを特徴とする請求項1～9のいずれか1項記載の電気泳動媒体。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか1項記載の電気泳動媒体及び光学的検出手段を含む分析装置。

【請求項12】 前記光学的検出手段は前記電気泳動媒体に接続されたセル、光源及び光検出器を含むことを特徴とする請求項11記載の分析装置。

【請求項13】 試料の検出は、電気泳動媒体から溶出した試料に励起光を照射し、蛍光を検出することによって行われることを特徴とする請求項12記載の分析装置。

【請求項14】 前記光検出器は撮像装置であることを特徴とする請求項11、12又は13記載の分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はDNA、RNA又は蛋白

などの分離検出装置に関し、特に新規なゲル電気泳動媒体及びそれを用いる分析装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 DNA、RNA等の分離分析技術は、遺伝子解析や遺伝子診断を含むライフサイエンス分野の基礎技術として重要である。特に最近では、ヒトゲノム解析に関連して高速・高スループットでDNA等を分析できる装置の開発が望まれている。

【0003】 従来、DNA塩基配列決定をはじめとするこれらの物質の分析にはゲル電気泳動装置が用いられてきた。例えば蛍光検出を用いるDNAシーケンサーでは、2枚のガラス板(30cm×40cm)の間に厚さ0.2～0.3mmのポリアクリルアミド製ゲルを作製し電気泳動分離媒体として用いていた。最近では、より高速・高スループットの分析法を求めるニーズに答えてゲルキャピラリー電気泳動、特にキャピラリーを多数本並べて同時に電気泳動させる方式が開発されている。この方式は、内径0.05～0.1mm、外径0.2～0.3mmの溶融石英製キャピラリーにゲルを詰めて使用している〔アナリティカル ケミストリー、第62巻、第900頁(1990年) (Analytical Chemistry 62, 900 (1990))〕。この方式は、平板型ゲルに比べて発熱が小さいため大きな泳動電界をかけることができる利点があり、高速泳動に適している。実際、従来4～5時間かかっていた泳動分離を1時間以内で行えるなど、注目される結果が得られているが、キャピラリーが高価であることや、多くのサンプルを同時に泳動させることができないなどの難点があった。特に後者についてはキャピラリーを複数本並べたマルチキャピラリー方式の検出装置の実現が望まれていた。

【0004】 また最近、Mathies らは、キャピラリーを多数本並べたキャピラリーアレー電気泳動を報告している〔アナリティカル ケミストリー、第64巻、第967頁(1992年) (Analytical Chemistry 64, 967 (1992))〕。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、このマルチキャピラリー方式は高価なキャピラリーを多数本並べて使用するものであり、しかもそれらは数回使用するとゲルが劣化して使用できなくなるため、ランニングコストが非常に高くつく難点があった。また、測定の度毎にキャピラリーを位置合わせして並べたり、測定部の被覆を除去しなければならないなど測定に要する手間も大きかった。

【0006】 そこで、キャピラリー方式の持つ長所、すなわち、

1. 高速・高スループット泳動が可能であること
 2. 電界注入できるので試料注入が容易であること
- などの長所を保持し、上述した難点を取り除いた手法の開発が望まれていた。本発明は、このような要求に答え

る新規なゲル電気泳動媒体及びそれを用いた分析装置を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明では、高分子物質でキャピラリーを構成するか、あるいは高分子シート中に多数のキャピラリーを形成させてゲルを充填し、電気泳動媒体として用いることによって前記目的を達成する。複数のキャピラリー泳動路は、少なくとも2枚のシート状高分子フィルムの間に設けられた溝で構成することができ、一例としては2枚のシート状高分子フィルムの間に挟まれたスペーサシートによって形成される。

【0008】キャピラリーアレーシートの一端部における泳動路の配置密度は他端部における泳動路の配置密度と異なり、配置密度が粗である方の端部は各キャピラリーが先端から所定長さだけ相互に分離されて試料注入部となり、配置密度が密である端部は検出部に接続される。本発明の電気泳動媒体は光学的検出装置と組み合わせる分析装置を構成する。検出は、試料が電気泳動媒体から溶出した後に行うのが好適である。

【0009】

【作用】高分子物質によるキャピラリーは、高分子シート中に型を用いた加圧成形やエッチングの技術を用いて、あるいは中空糸製造法などによって廉価に作製することができる。試料注入側と検出側でキャピラリーの密度分布を変化させて作製し、試料注入側ではキャピラリー密度を粗にして相互に分割することにより、一本毎に独立してキャピラリーに試料注入する操作を作業性よく能率的に行うことができる。また、検出側は密に配置したので、検出部がコンパクトになるとともに高効率の検出を行うことができる。分析装置では、有機物高分子物質によって作製したキャピラリーから試料を溶出した状態で検出を行うため、有機物高分子物質に起因する強い蛍光を生じることがないので高感度の計測を行うことができる。

【0010】

【実施例】本発明の実施例について以下に説明する。図1は、本発明の一実施例によるゲルキャピラリーアレーシート9の一部破断斜視図である。このゲルキャピラリーアレーシート9は、厚さ約0.2mmの2枚のPET（ポリエチレンテレフタレート）フィルムからなる保持シート1、2の間に厚さ約0.1mmのスペーサシート3を挟んだ構造を有している。スペーサシート3には、光エッチング加工等によって図示するような細溝6が形成されている。スペーサシート3に設けられた溝6の幅は0.1～0.2mmであり、溝のピッチはシート下部で約0.5mm、シート上部で約2mmである。溝6は図の例では10本設けられているが、特に本数に制限があるわけではない。各溝6は内部にゲルが充填されていて泳動路を形成しており、泳動路長は約30cmである。

【0011】ゲルキャピラリーアレーシート9の上部は、先端から約5cmの長さに渡って切れ目を入れることにより個々の泳動路5に分割されている。この溝が粗に配置されて先端が分割された側7は試料注入部となり、密に配置された側8は測定時に検出部に接続される。このようにゲルキャピラリーアレーシート9の試料注入部側7でキャピラリー6を粗に配置し、個々のキャピラリー5を分割することにより、ゲルキャピラリーアレーシートの取扱い及び各泳動路6の試料注入部4への試料の注入操作を容易に行うことができる。また、検出部側8のキャピラリー配置を密にすることにより、検出装置がコンパクトになり分析の信頼性を高めることができる。

【0012】このゲルキャピラリーアレーシート9は、次のようにして作製される。まず保持シートとなるPETフィルム1に、スペーサシート3となる感光性基を含むアクリルシート等の感光性樹脂フィルムを接着剤により接着する。それを細溝マスクパターンを用いて露光し、露光部あるいは未露光部を溶解して泳動路となる溝パターンを形成する。溝パターンは、シート9の一方の側8から他方の側7に向かって末広りの配置をとる。スペーサシート3に泳動路となる溝パターンを形成した後、その上に第2の保持シートであるPETフィルム2を接着剤により接着する。次いで、所望の形状に切断し溝が粗に配置された側7に先端から所定の長さまで切り込みを入れ、各キャピラリー管5の先端部分を分離してキャピラリーシートが作製される。

【0013】次に、こうして作製されたキャピラリーシート的一端をシリンジ中に押し込んで密封固定し、シリンジ中に入れられた架橋剤を3重量%〔3% C（Cross linking material concentration）〕含む5重量%〔5% T（Total concentration）〕のポリアクリルアミドゲル溶液（5% T, 3% C）を細溝中に圧入してゲルキャピラリー6を形成する。保持シート1、2の材質としては、PETの他にもポリアクリル樹脂やポリイミド樹脂などポリアクリルアミドゲルとなじみの良い高分子を使用することができる。スペーサシート3は整形した高分子シートを使用せず、液状のものを一定の厚さに塗布してシートを得てもよい。

【0014】なお、本実施例では3枚の高分子シートを重ね、その中間のスペーサシートをエッチング加工してキャピラリーアレーシートを作製したが、整形された2枚のシートを重ねてキャピラリーアレーを形成してもよい。すなわち、一方の保持シート1に金型を用いた加圧成形又はエッチングによって細溝を形成し、その上に他方の保持シート2を接着することによってキャピラリーアレーシートを作成してもよい。

【0015】図1のキャピラリーアレーシート9は、1日放置してゲル形成後、図2の装置に装着して使用する。シート下端部あるいは上端部のゲル形成が乱れてい

5

るときにはシート端の一部を切断除去し、ゲル端面をきれいな状態にして使用する。ゲルの末端部を常にきれいな状態とするためには、第3図に示すように、キャピラリーアレーシート9の端部をガイドカバー18で覆い、シートの他端部から前述のようにシリンジを用いてゲルをガイドカバー18の間にまで充填し、ガイドカバー18間に補助部ゲル19を作成する。そして、使用時にガイドカバー18をはずして鋭利な刃物で図3に破線部20で示した位置で補助部ゲル19を切断除去するようにするの有利である。

【0016】ゲルキャピラリーアレーシート9は、下部8をホルダーガイド21で挟んでフローセル11内にセットされる。ホルダーガイド21は、キャピラリーアレーシート9に接する側面に上下方向に連通する複数の流体流通路が設けられている。セル11内にはバッファ液(1×TBE; 90mM Tris borate, pH8.3, 0.2mM EDTA)が満たされており、このバッファ液は前記ホルダーガイド21に設けられた流路を通じて上から下へキャピラリーアレーのまわりを流れ、セル11の検出部12を通った後、シースフロー液流出路10を通過して下部バッファ液14に流入する。

【0017】キャピラリーへの試料注入は、図示しない試料溜にキャピラリーアレーシート9上部の分離したキャピラリー5を1本づつ挿入し電界を短時間印加することによって、試料注入部4から各キャピラリーへ電界注入される。試料が注入されたキャピラリー5の端部は共通のバッファ液槽13に浸され、上下のバッファ液槽13、14に挿入した電極(図示せず)に泳動電圧を印加することにより、試料の電気泳動分離が行われる。

【0018】ゲルキャピラリー部で分離された試料はキャピラリー端部から流出してフローセル内を下部に向かって泳動するが、その途中の検出部12で紙面垂直方向から入射された図示しないレーザ光線によって照射される。そして、試料から発せられた蛍光は、キャピラリーアレーシート9の表面に向けて配置されたフィルター15を通して高感度CCDカメラ16によって同時に検出される。CCDカメラ16からの検出信号はデータ処理装置17に送られて必要な演算処理が施される。有機物キャピラリーアレーの無い泳動路上を励起光照射して蛍光検出を行うので、キャピラリーアレーから発せられる蛍光が検出を妨害することがない。

【0019】シースフロー液流出路10は必ずしも各キャピラリー毎に分離して設ける必要はないが、各キャピラリーに対応させた中空のキャピラリーアレーとし泳動路を中心に多数のシースフローを形成させるようにすると、隣接するキャピラリーの溶出物が検出部12で混合するのを確実に回避することができて有利である。もちろんキャピラリーアレーシート9の下端部を蛍光の少ない石英製のキャピラリーアレーに接続してセル11を省略することもできる。

6

【0020】また、キャピラリーの試料注入部は泳動電圧の印加で発熱してゲル破壊がおこり易く、そのため繰り返し使用することが難しい。試料注入側7を短いキャピラリーに接続して使用すると、ゲルが変質した接続キャピラリーを交換するだけでゲルシートを多数回使用できる利点がある。検出の方式の1例として、図2には、一列に並んだ泳動路を側面から同時に光照射し、線状蛍光像をCCDカメラで撮像するシステムを示した。図2は1種類の蛍光体からの蛍光像を検出する例であるが、プリズム等を用いて複数の蛍光体を波長分離して計測することも可能である。また、光源と検出器を固定した移動台をキャピラリーアレーシートに沿って移動走査することにより、各試料からの蛍光を順次検出するようにしてもよい。

【0021】さらに、前記実施例は複数のキャピラリーを高分子シートによって形成したが、現在種々の分野で使用されている中空系の製造技術によって有機物ポリマーの中空管すなわちキャピラリーを作り、そのキャピラリーを多数本束ねて用いることもできる。その場合、束ねたキャピラリーの一端を一直線上に配列すると、蛍光検出法等で測定する際、好都合である。高分子ポリマーとしてはPET、ポリアクリル樹脂、ポリイミド樹脂などを使用することができる。キャピラリー中へのゲルの注入は、前記実施例と同様にシリンジを用いる圧入法で行うことができる。

【0022】

【発明の効果】以上述べたように、本発明によれば、柔軟で扱いやすくキャピラリーの持つ長所を備える廉価なキャピラリーアレーを得ることができる。また、キャピラリーの厚さや幅は高精度に制御できるので泳動路間の泳動速度差を小さくすることができる利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例によるゲルキャピラリーアレーシート9の概念図。

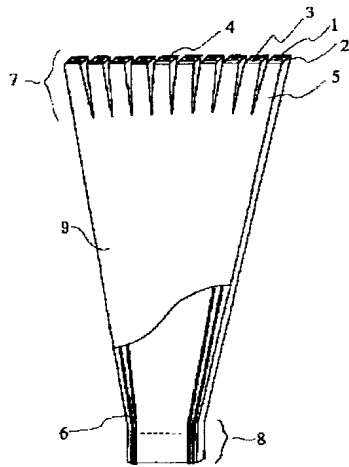
【図2】図1のゲルキャピラリーアレーシートを用いた電気泳動分析装置の概念図。

【図3】補助部ゲル付キャピラリーアレーシート9の説明図。

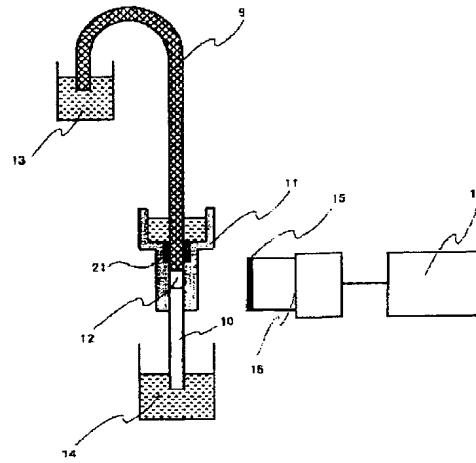
【符号の説明】

1, 2…有機高分子保持シート、3…スパーサーシート、4…ゲルキャピラリー試料注入部、5…分離したキャピラリー管、6…ゲルキャピラリー、7…分離キャピラリー部、8…計測部バックトキャピラリー管部、9…ゲルキャピラリーアレーシート、10…シースフロー液流出用キャピラリー、11…フローセル、12…検出部、13…上部バッファ液、14…下部バッファ液、15…フィルター、16…高感度CCDカメラ、17…データ処理装置、18…ガイドカバー、19…補助部ゲル、20…切断部位、21…ホルダーガイド

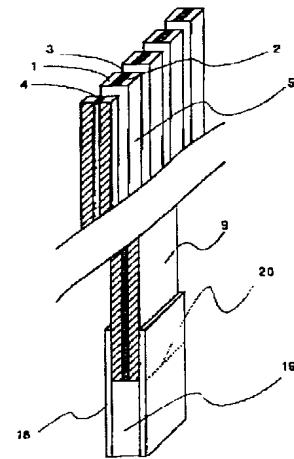
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 穴沢 隆
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 永井 啓一
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内